

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup>

A 61 K 37/02

識別記号

ACA  
ADA

庁内整理番号

8615-4C

④ 公開 昭和63年(1988)8月10日

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全7頁)

⑬ 発明の名称 トロンビン製剤

⑭ 特 願 昭63-14793

⑮ 出 願 昭63(1988)1月27日

優先権主張 ⑯ 1987年1月28日 ⑰ 米国(US) ⑱ 007,555

⑲ 発 明 者 スティーブン・バーナード・シルバーリング アメリカ合衆国ニューヨーク州(11375) フォレストヒルズ、セブンティセカンドロード112-41

⑲ 発 明 者 ロウランド・パーカー・ブライス・ジュニア アメリカ合衆国ミシガン州(48094) ワシントン、チェロキードライブ5563

⑳ 出 願 人 ワーナー・ランバー・ト・コンパニー アメリカ合衆国ニュージャージー州(07950) モーリスブレインズ、ティバーロード201

㉑ 代 理 人 弁理士 高木 千嘉 外2名  
最終頁に続く

## 明 細 書

1. 発明の名称 トロンビン製剤

2. 特許請求の範囲

1) (a) 精製トロンビン、

(b) ポリオール、および酢酸塩イオンまたは燐酸塩イオンを含有する緩衝剤、を含有しており、pH約5.0～約8.0を有する安定なトロンビン組成物。

2) 前記緩衝剤が燐酸塩イオンを含有しそして前記pHが約6.0～約6.5である請求項1記載の組成物。

3) 前記緩衝剤が酢酸塩イオンを含有しそして前記pHが約5.0～約5.5である請求項1記載の組成物。

4) 前記ポリオールがグリセロールである請求項2記載の組成物。

5) 前記ポリオールがグリセロールである請求項3記載の組成物。

6) 請求項4記載の組成物および基質からなる、創傷手当に使用するための止血剤。

7) 請求項5記載の組成物および基質からなる、創傷手当に使用するための止血剤。

8) 精製トロンビンをポリオールおよび緩衝剤と接触させる工程からなり、最終的なpH約5.0～約8.0を有する安定化された組成物の製法。

9) 前記緩衝剤が燐酸塩緩衝剤でありそして最終的なpHが約6.0～約6.5である請求項8記載の方法。

10) 前記緩衝剤が酢酸塩緩衝剤でありそして最終的なpHが約5.0～約5.5である請求項8記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

タンパク分解酵素であるトロンビンは止血にとって必須物質である。このものはフィブリン生成による凝血塊の形成における主要な試薬で

ある。凝固助剤としてのその有効性ゆえにトロンビンおよびその製剤は外科的処置中の出血を抑制するのに有用である。乾燥トロンビンは入手しうるが、取扱いおよび時間的配慮から液体製剤が一般に好ましい。

今まで、貯蔵安定性かつ外科手術中すぐ使用できる高度に安定な液体トロンビン製剤は何ら存在していない。これはトロンビンが、水または食塩水に溶解された場合に、トロンビンタンパク質の変性および自己分解ゆえにその活性を速やかに喪失することが原因である。

今、適当な媒体中における精製トロンビンに安定化量のある種の緩衝剤を添加することにより、無菌で貯蔵安定性のトロンビン製剤が製造されることが見出された。所望の場合は、食塩水および1種またはそれ以上のポリオール安定剤も使用されうる。

この発明は1985年10月28日出願の米国特許出

場合にはそれより良好な活性さえ示した、すなわち磷酸塩系で12か月後で100%そして酢酸塩系で12か月後で95%を示した。

本発明のトロンビン組成物およびその製法は血液凝固を助成するための慣用の製剤およびその製法に比較していくつかの長所を有する。

粉末製剤と異なり、本発明組成物は使用に先立ち何ら再構成する必要がない。従って、1種またはそれ以上の成分(類)または容器(類)の計測、混合、滅菌等は重要な考慮要件ではない。本発明の製剤は最終使用前に最小限の、すなわちわざわざかしかまたは何ら調製を行うことなく使用されうる。

その上、本発明のトロンビン含有物質の安定性ゆえに製品の貯蔵目録および/または回転の必要が大きく排除されることとなる。4℃で約1週間しか安定でない大部分のトロンビンの食塩水溶液または水溶液と異なり、本発明による

願番号第791,836号の記載に関連するものである。

好ましい態様の一つにおいては、50%(v/v)のグリセロールおよび0.05M磷酸塩緩衝液(pH 6.0)を含有する0.45M NaCl溶液中における2000U/ml(単位/ml)の精製トロンビンを含む溶液が調製された。この溶液は、室温(25℃)で6か月貯蔵した後もそのもとの凝固活性のすべてを保有していた。室温で12か月貯蔵後でもこの溶液はまだもとの活性の80%を保持していた。

もう一つの好ましい態様においては、0.05Mの酢酸塩緩衝液、2.7%(0.45M)のNaClおよび25%のグリセロールと共に1500U/mlの精製トロンビンを含む組成物はpH5で25℃で6か月貯蔵後でフィプロメーターの示度によれば86%の活性を示した。

これらの好ましい組成物は4℃で貯蔵された

製剤は通常の冷蔵温度(すなわち、約4℃)および室温(すなわち約25℃)で6か月またはそれ以上の期間安定である。

高濃度のグリセロール、スクロース、および他のポリオールが溶液中におけるタンパク質を安定化させることは知られている。トロンビンの場合、グリセロール濃度67%で1000U/mlのトロンビン溶液を大きく安定化させることが知られている。しかしながら、高濃度のグリセロールを用いることは無菌トロンビン溶液の大規模製造においては実際的でない、何故ならかかる製剤の粘度が高くなるからである。50%またはそれ以下のグリセロールを含有する本発明組成物によりこの問題が回避される。

本発明の他の利点および観点は以下の記載を考察することにより明らかとなろう。

本発明は最も広義には下記事項に関する。

1. 精製トロンビン、ポリオール、および少く

とも1種の緩衝剤を含有するトロンビン組成物好ましくは溶液。

Ⅱ. 前期Ⅰ項の調製物を含有する、傷手当用止血製剤。

Ⅲ. 前期Ⅰ項のトロンビン組成物の製法。

本発明により調製された製剤は液体媒体中に実質上精製されたトロンビン、および本発明の緩衝剤の1種またはそれ以上を含有しなければならない。これらは食塩水、およびタンパク質製剤中に慣用に使われる他の物質を含有する。

「製剤」なる用語を用いてはいるが、その中にはトロンビンが実質的に可溶化されるかまたは高度に分散された形態で、本発明におけるポリオールおよび緩衝剤の1種またはそれ以上と組み合わせられて存在するすべての種類の配合物が包含されることが意図されることに注意されねばならない。

酢酸塩緩衝液または燐酸塩緩衝液のいずれかおよび食塩水を含有するグリセロールと混合して本発明の安定化された溶液を調製する。

トロンビンは生理食塩水、すなわち約0.9%のNaClを含有する水溶液中に溶解しうることが知られている。しかしながら、他の食塩溶液も使用されうる。さらに、かかる溶液中のNaClの全部または一部を他の適当な塩の1種またはそれ以上で置換することもできる。

本発明の製剤にとって好ましい媒体は水である。しかしながら、本発明の製剤におけるトロンビンの溶解度および/または安定性に不利な影響を及ぼさない他の希釈剤の1種またはそれ以上を用いることが望ましい。

かかる希釈剤の一つはグリセロールである。他の有用なポリオールにはマンニトール、ソルビトール、マクロース、グルコース等が含まれる。これらの混合物を用いることもできる。

液体製剤が一般に好ましい。トロンビンの溶液が大いに好ましい。液体製剤が調製される場合は、使用される溶媒(類)またはその他の希釈剤(類)がトロンビンと適当な混和性を有していて、それゆえ製剤標準、例えばバッチからバッチへのトロンビン濃度の均一性、に容易に合致しうることが一般的に好ましい。

用いられるトロンビンは二段階イオン交換クロマトグラフィーにより得られる精製トロンビンである。第一段階で、大部分の非トロンビンタンパク質を吸着させるためにDEAEセファローズ(Sepharese)®が用いられる。第二段階では、CMセファローズを用いてトロンビンを吸着させそして残る非トロンビンタンパク質はカラムを通過せしめる。このトロンビンは0.45M NaCl中の0.05M酢酸塩(pH5.0)を用いるかまたは0.45M NaCl中の0.05M燐酸塩(pH6.0)を用いて溶離させる。次にこのトロンビン溶液を、

グリセロールが使用されるのが非常に好ましい。

グリセロールまたは他のポリオール成分(類)は組成物の総重量に基づき約10~約60重量%、好ましくは25~50重量%の総濃度で使用されうる。

もし別に断わりなければ、示される量はすべて組成物の総重量に基づく重量%である。

適当な緩衝系は、その水溶液が最終的なトロンビン溶液のpHを約5.0~約8.0、好ましくはpH約5.0~約6.0に保持するものである。燐酸塩緩衝液が用いられる場合はその製剤の最終的なpHが約6.0~約6.5でありそして酢酸塩緩衝液が用いられる場合は最終的なpHは約5.0であることが大へん好都合である。

pHは組合せ電極を用い通常のpH計で測定される。

有用な緩衝系には酢酸塩、燐酸塩、コハク酸

塩、重炭酸塩、イミダゾール、トリス、および M. E. Good氏他の Methods in Enzymol., 24, Part B, 53(1972); および W. F. Ferguson氏他の Anal. Biochem., 104, 300(1980)記載の双性イオン緩衝剤が包含される。

本発明の緩衝系に使用するのに適当な試薬には MES, ACES, BES, MOPS, TES, HEPES等が包含される。燐酸塩はカルシウムイオンが存在しないかまたは EDTA の存在下でのみ使用されるべきである。かかる試薬の混合物も使用されうる。もし混合緩衝剤が用いられる場合は、最終的な pH は適当に調整されねばならない。

ホスヘートイオンおよびアセテートイオンを含有する緩衝剤が好ましい。それらの混合物を用いることもできる。

米国特許出願番号第 06/791,836 号に記載の緩衝系も本発明で使用されうる。

緩衝剤は水および／または他の適当な希釈剤

(類)と共に、緩衝溶液中に総濃度約 0.02M ~ 約 1M、好ましくは約 0.05M ~ 約 0.10M で存在しよう。

他の種々の慣用の添加剤、例えば酸化防止剤、着色剤、界面活性剤等を使用することもできる。場合によりグルタチオンも一成分として使用されうる。アミノ酸が場合により使用されうるが、それらは、精製されたトロンビンに及ぼすポリオールおよび緩衝成分の安定化作用を妨害するような量で存在してはならない。一般に、それらはもし存在するとすれば 0.5% またはそれ以下の少量でのみ使用されるのが好ましい。

一般に、これまでに論じられた成分の濃度範囲は第 I 表に示される限界内であろう。表中の % は組成物の総重量に基づく。

第 I 表

成 分	重 量 %		
	およその範囲	好ましい範囲	大いに好ましい範囲
トロンビン、 単位/mg	10-10,000	50-5,000	500-2,000
緩衝溶液 (M)	0.01-1.0	0.02-0.2	0.05-0.10
希釈剤/溶媒	-	-	-
ポリオール	0-50	10-50	25-50

## 止血剤

止血物質例えばゲルフォーム (GELFOAM)®、サージセル (SURGICEL)®、およびアビセル (AVI-CEL)®、および今日食塩水中トロンビン末またはトロンビンと組み合わせてまたは単独で使用されるコラーゲンは種々の方法を用い、本発明による安定化されたトロンビン製剤と一緒に効果的に使用されうる。好ましくは、安定化された溶液を止血剤上に吸収させそしてパッドを凍結乾燥させ、無菌的に包装する。

抗菌剤または抗生物質も、特に感染予防が決定的に重要である火傷患者に使用するために前記パッド中に混入されうる。さらに、界面活性剤および NaCl 以外の塩も使用されうる。かかる添加剤の 1 種またはそれ以上が存在する場合はそれらの濃度は一般に第 II 表に示される範囲内にある。

第 II 表

添 加 剤	重 量 %		
	およその範囲	好ましい範囲	大いに好ましい範囲
界面活性剤	0-2	0-0.5	0-0.2
酸化防止剤	0-1	0-0.2	0-0.1
抗 菌 剤	0-1	0-0.5	0-0.2
他の添加剤 例えば塩	0-5	0-3	0-1

本発明による止血剤の製造に適当な包帯の種類の一つは米国特許第 4,363,319 号に記載されている。

## トロンビン製剤の製造

好ましくはウシ起原の粗製トロンピンを前記の2段階イオン交換クロマトグラフィーにより精製する。この精製トロンピンを0.45M NaCl中の0.05M 磷酸塩(pH6.0)を添加することによるか、または0.45M NaCl中0.05M 酢酸塩(pH5.0)を添加することによりCM-セファロースから分離する。カラムから溶出したトロンピンは高度に濃縮されており、本発明によるトロンピン製剤を製造するためには、希釈されねばならない。これは、例えば磷酸塩緩衝食塩水中における溶出したトロンピンにpH6.0の0.05M 磷酸塩、0.45M NaCl中の50%(w/w)グリセロールを含有する同量の溶液を添加することにより行われる。得られるトロンピン製剤は25%グリセロール、0.05M 磷酸塩、0.45M NaCl中に所望濃度の精製トロンピンを含有している。この特定の製剤はpH約6.0を有する。

得られる製剤はBBLフィブロメーターを用い

希釈された血漿0.2mlを加える。これを37℃に3分間保ち、次にこの溶液に希釈されたトロンピン溶液のこれも37℃で3分間保持されたもの0.1mlを加える。凝固時間はフィブロメーターの示度から直接測定する。残留するトロンピン単位/mlの数字はトロンピン濃度対凝固時間の標準曲線から測定される。

#### 実施例 II

第III表に示されるデータにより、pH6.0のグリセロール磷酸塩系における精製トロンピンの安定性が証明される。

て凝固時間を測定することにより検定する。

以下の実施例により本発明をより詳しく説明する。

#### 実施例 I

磷酸塩緩衝されたトロンピン組成物の調製は前記したとおりである。酢酸塩緩衝された組成物は0.05M 磷酸塩(pH6.0)に代えてpH5.0の0.05M 酢酸塩を用いることにより同様にして調製される。

本発明のトロンピン組成物は下記操作により検定される。

トロンピン活性レベルはBBLフィブロメーターで凝固時間を測ることにより測定される。フィブリノゲン源はプールされたヒト血漿を0.9%食塩水で1:1に希釈したものである。トロンピン溶液はイミダゾールにより緩衝された食塩水中の0.5%ポリエチレングリコール8000を用いて200倍に希釈する。凝固カップに

第 III 表

種々のグリセロール-磷酸塩(0.45M NaCl、0.05M 磷酸塩、pH6.0)配合物中における4℃および25℃での精製トロンピン(2000単位/ml)の溶液安定性

貯蔵温度 (℃)	貯蔵時間 (月)	試験配合物中の活性%			
		グリセロール	A 50%(V/V)	B 25%	C 10%
25	0	100	100	100	100
	1	93	98	—	—
	2	87	96	—	—
	3	104	96	—	—
	4	—	—	45	20
	6	105	81	—	—
4	12	80	25	—	—
	0	100	100	100	100
	1	92	108	82	88
	2	90	110	87	78
	3	88	109	96	79
	6	106	115	101	62
	12	106	*	71	27

\*汚染

グリセロールレベルが25%より低い場合は室温ではトロンピンの安定性が保持されないこ

とに注意すべきである。

#### 実施例 III

第IV表に示されるデータによりpH5.0のグリセロール酢酸塩系中における精製トロンビンの安定性が証明される。

第IV表

25%グリセロール酢酸塩配合物中における4℃および25℃での精製トロンビン(1500単位/μl)の溶液安定性

		試験配合物中の活性%	
		A	B
(NaCl)		2.7%	2.7%
(酢酸塩)		(0.45M)	(0.45M)
		0.05M	0.10M
(pH)		5.0	5.0
貯蔵温度 (℃)	貯蔵時間 (月)		
4	0	100	100
	0.25	93	94
	1	94	91
	2	102	108
	3	102	102
	6	100	110

活性の86%を保持していることが判明した。

#### 実施例 IV

##### 止血剤の製造

0.45M食塩水を含有するpH5.0の0.05M酢酸塩緩衝液中における精製トロンビンの溶液を用いてゲルフォーム(gelform®)パッドを飽和する。このパッドを凍結乾燥する。かかる乾燥パッド中に含有されるトロンビンは室温においてさえもその安定性を長期間にわたり保持する。グリセロール/酢酸塩中に精製トロンビンを飽和しそして湿潤状態で貯蔵されたゲルフォームのパッドは室温で6日後には完全に分解した。

当業者が考えうるような妥当な変形は本発明の範囲から逸脱することなく行われうることに留意されたい。

貯蔵温度 (℃)	貯蔵時間 (月)	A	B
25	12	95	96
	0	100	100
	0.25	99	97
	1	102	102
	2	98	98
	3	89	87
	6	86	91
	12	56	57

同じ配合物中における不純なトロンビンと精製トロンビンの安定性を比較することが有益である。不純なトロンビンの溶液(1500単位/μl、25%(w/w)グリセロール、0.05M酢酸塩および0.45M NaCl中、(pH5.0))は25℃で1か月貯蔵した場合でその当初の凝固活性の68%を保有していることが判明した。1500単位/μlの精製トロンビンを含む同様の配合物は25℃で1か月経過後でその当初活性の100%を保持し、そして25℃で6か月経過後でその

第1頁の続き

⑦発 明 者

ラッセル・アルマー・  
ネスビット

アメリカ合衆国ニュージャージー州(08876)サマービ  
ル。ミレンアベニュー292

⑧発 明 者

マーデイ・バキル・フ  
オージ

アメリカ合衆国ニュージャージー州(07836)フランダー  
ス。ティンバーラインドライブ11